

本文引用:邹攀,许红森,伍永慧,罗欢,蔺婷,王贤文,周芳亮,何迎春.网络药理学、分子对接技术结合体外实验探讨益气解毒方及其活性成分槲皮素抑制鼻咽癌增殖的机制[J].湖南中医药大学学报,2022,42(8):1300-1309.

网络药理学、分子对接技术结合体外实验探讨益气解毒方及其活性成分槲皮素抑制鼻咽癌增殖的机制

邹攀^{1,2},许红森¹,伍永慧^{2,3},罗欢¹,蔺婷^{2,3},王贤文^{3,4},周芳亮^{2,3},何迎春^{2,3*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南省中医药防治眼耳鼻喉咽喉疾病与视功能保护工程技术研究中心,湖南长沙410208;3.中医药防治眼耳鼻喉咽喉疾病湖南省重点实验室,湖南长沙410208;4.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007)

[摘要] **目的** 基于网络药理学、分子对接技术结合体外实验,探讨益气解毒方及其活性成分槲皮素抑制鼻咽癌增殖的可能机制。**方法** 运用TCMSP、BATMAN-TCM、GEO、GeneCards、OMIM、TTD、PharmGkb等数据库检索益气解毒方的化学活性成分及鼻咽癌的作用靶点;STRING数据库构建可视化PPI网络;关键作用靶点进行GO和KEGG富集分析;采用分子对接验证槲皮素的可能靶点TP53、MYC、MDM2和AKT1;采用CCK-8法和RTCA法检测益气解毒方及主要活性成分槲皮素抑制鼻咽癌细胞CNE-2增殖的效应;采用Western blot检测药物对细胞增殖及PI3K/Akt信号通路关键蛋白表达的影响。**结果** 筛选得到益气解毒方有效化学成分197种,得到潜在共同作用靶点173个,核心基因为TP53、JUN、MAPK3、MYC等;KEGG分析主要富集在PI3K/Akt、MAPK等信号通路;分子对接结果示槲皮素与TP53、AKT1、MDM2、MYC均具有良好的结合位点;体外实验证实益气解毒方及槲皮素能抑制细胞增殖;药物能下调增殖相关蛋白XIAP、PCNA、Survivin及PI3K/Akt信号通路蛋白PI3K、AKT1、p-AKT1、mTOR的表达水平;激活PI3K/Akt信号通路后,槲皮素抑制细胞增殖的效应被削弱。**结论** 益气解毒方及主要活性成分槲皮素可能通过下调PI3K/Akt信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖。

[关键词] 网络药理学;分子对接;益气解毒方;槲皮素;鼻咽癌;实验验证

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.08.012

Discussion of the mechanism of Yiqi Jiedu Prescription and its active ingredient quercetin in inhibiting the proliferation of nasopharyngeal carcinoma by network pharmacology, molecular docking technology combined with in vitro experiments

ZOU Pan^{1,2}, XU Hongmiao¹, WU Yonghui^{2,3}, LUO Huan¹, LIN Ting^{2,3}, WANG Xianwen^{3,4}, ZHOU Fangliang^{2,3}, HE Yingchun^{2,3*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Provincial Engineering and Technological Research Center for Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Chinese Medicine and Protecting Visual Function, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan Provincial Key Laboratory for Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 4. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To explore the possible mechanism of Yiqi Jiedu Prescription and the active ingredient quercetin in inhibiting the proliferation of nasopharyngeal carcinoma based on network pharmacology, molecular docking and in vitro

[收稿日期]2022-03-25

[基金项目]国家自然科学基金项目(81973914,82104941);湖南省教育厅项目(21A0229,21C0234);湖南省卫计委项目(202207015643, 202207015049);湖南中医药大学国内一流建设学科中医学项目(2022ZYX03,2022ZYX22)。

[第一作者]邹攀,女,博士研究生,研究方向:中西医结合防治耳鼻喉咽喉疾病和肿瘤。

[通信作者]*何迎春,女,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:yingchunhe@aliyun.com。

experiments. **Methods** Databases such as TCMSp, BATMAN-TCM, GEO, GeneCards, OMIM, TTD and PharmGkb were used to search the chemical active ingredients of Yiqi Jiedu Prescription and targets of nasopharyngeal carcinoma; STRING database was used to build a visual PPI network; GO and KEGG enrichment analysis were carried out for key targets; molecular docking was used to verify the binding sites of quercetin with TP53, MYC, MDM2 and AKT1; CCK-8 method and RTCA method were used to detect the effects of Yiqi Jiedu Prescription and its main compound quercetin on the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2; Western blot was used to detect the effect of drugs on cell proliferation and the expression of key proteins in PI3K/Akt signaling pathway. **Results** A total of 197 effective compounds of Yiqi Jiedu Prescription were screened, and 173 potential co-action targets were obtained. The core genes were TP53, JUN, MAPK3, MYC, etc. KEGG analysis were mainly enriched in PI3K/Akt, MAPK and other signaling pathways. Molecular docking showed that quercetin had good binding sites with TP53, AKT1, MDM2 and MYC. In vitro experiments had confirmed that Yiqi Jiedu Prescription and quercetin can inhibit cell proliferation. Drugs can down-regulate proliferation-related proteins XIAP, PCNA, Survivin and the expression levels of PI3K/Akt signaling pathway proteins PI3K, AKT1, p-AKT1, and mTOR. After activating the PI3K/Akt signaling pathway, the effect of quercetin on cell proliferation was weakened. **Conclusion** Yiqi Jiedu Prescription and its main compound quercetin may inhibit the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells by down-regulating PI3K/Akt signaling pathway.

[**Keywords**] network pharmacology; molecular docking; Yiqi Jiedu Prescription; quercetin; nasopharyngeal carcinoma; experimental verification

鼻咽癌可归属于中医学“失荣”等范畴,明代陈实功《外科正宗》云:“失荣者,其患多生肩之以上,初起微肿,皮色不变……愈久愈大,越溃越坚,犯此俱为不治”。中医学认为,鼻咽癌的发生为在体内外各种致病因素的影响下,出现气血凝滞或痰浊结聚,以致经络受阻,积聚而成,或痞塞日久,则积聚壅结,郁火化热,火毒内困而成。古今医家常用清热解毒、软坚散结、益气养阴等治法。田道法教授团队遵循先贤抗鼻咽癌的宝贵经验自创益气解毒方,以黄连、黄芪固护元气、鼓邪外出,达到“祛邪不伤正”和“邪去正自安”的目的;以党参补益肺气和白花蛇舌草清热解毒、散毒祛毒;天花粉和茯苓健脾养阴、充养其身。全方补泻共用、气阴双补,共奏益气解毒、平和抗毒之效,在临床应用多年并取得良好疗效^[1-2]。中药复方乃复杂物质体系,药效物质基础和作用靶点之间存在错综复杂的网络关系。分析并揭示这一复杂网络之间的相互关联性,阐明复方中众多药效物质基础及其作用机制,是中医药亟待解决的重大科研任务^[3]。为了探究益气解毒方抗鼻咽癌的潜在作用机制,本研究通过网络药理学方法建立了益气解毒方化学成分-靶点网络,预测益气解毒方治疗鼻咽癌的作用机制,利用体外实验验证益气解毒方水提物及其活性成分槲皮素抑制鼻咽癌细胞增殖的效应及潜在作用靶点和相关通路,为复方及单体抗肿瘤提供更多的证据。

1 材料

1.1 细胞株

人低分化鼻咽癌细胞株 CNE-2(批号:BNCC 341794)购买于北京北纳创联生物技术研究所,由中医药防治眼耳鼻咽喉疾病湖南省重点实验室传代培养。

1.2 药物与主要试剂

益气解毒方(黄芪 30 g,茯苓 10 g,党参 10 g,天花粉 10 g,黄连 10 g,白花蛇舌草 10 g,甘草 6 g),购自湖南中医药大学第一附属医院中药房,水提物具体制备方法参考本课题组前期研究^[4]。顺铂(批号:MKCM2435,美国 Sigma 公司);槲皮素标准品(批号:C28J11Y116820,上海源叶生物科技有限公司)。

1.3 主要仪器

恒温水浴箱(型号:BWS-27,中国上海一恒科学仪器有限公司);高速冷冻离心机(型号:MRZ16A022,德国 Beckman Coulter 公司);双人单面净化工作台(型号:SJ-CJ-2FD,中国苏州净化设备有限公司);CO₂培养箱(型号:HERAcell150i,美国赛默飞世尔公司);电泳仪(型号:JY600C,中国北京君意东方电泳设备有限公司);转膜仪(型号:690BR027656,美国 Bio-Rad 公司);实时无标记细胞功能分析仪(型号:RTCA DP,美国 ACEA 公司);倒置荧光显微镜(型号:AE31,中国麦克奥迪实业集团有限公司);双色红外荧光成像系统(型号:ODYSSEY CLx,美国 Gene 公司)。

2 方法

2.1 益气解毒方“活性成分-靶点网络”构建及鼻咽癌作用靶点筛选

网络药理学数据挖掘详细方法参照文献进行^[5-6]。为丰富数据扩大筛选量,运用中药系统药理学数据库及分析平台(TCMSP)及中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN-TCM)、GeneCards、人类孟德尔遗传数据库(OMIM)、药物基因组学知识库(PharmGkb)、治疗目标数据库(TTD)、GEO等多个数据库检索益气解毒方的化学活性成分及治疗鼻咽癌的作用靶点;BATMAN-TCM中药数据库以Score=100, $P=0.05$ 为检索条件,联合TCMSP数据库获得益气解毒方中7味中药(黄连、黄芪、天花粉、白花蛇舌草、茯苓、党参、甘草)的化学成分和潜在药物靶点,获得的药物活性成分、靶点导入Cytoscape 3.6.0软件中构建“活性成分-靶点网络”。

2.2 益气解毒方治疗鼻咽癌的PPI网络构建与关键靶点筛选

应用R语言绘制益气解毒方潜在药物靶点与鼻咽癌的靶点韦恩图;将上述靶点导入STRING网站进行蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)关系网络图构建;通过Cytoscape软件中的网络拓扑分析插件CytoNCA对PPI网络进行拓扑属性分析,获得关键核心靶点进行后续研究。

2.3 功能分析

应用R语言软件中clusterProfilerGO、clusterProfilerKEGG软件包对共同靶点进行基因本体论(Gene Ontology, GO)分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析。

2.4 分子对接

通过PubChem下载槲皮素的2D结构, ChemOffice软件将其能量最小化并导出为3D结构;通过PDB数据库下载核心靶蛋白受体的3D结构,利用Pymol软件对蛋白受体进行去除水分子和其他小分子的处理;然后使用Autodock Tools 4.0软件对蛋白受体分子进行加氢等前处理,最后通过Autodock Vina将处理后的潜在化学活性成分与蛋白受体分子进行分子对接。分子对接的结合能 $<0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,

表明蛋白受体与化合物结合稳定,结合能越低代表化合物与蛋白受体的结合活性越强,并将结合活性强的对接结果导入Pymol软件,绘制三维图进行可视化展示。

2.5 CCK-8法、RTCA实时无标记细胞功能分析仪和Cytation™ 5细胞成像多功能检测系统监测细胞增殖情况

CCK-8法参考文献^[7]进行。取对数生长期CNE-2细胞,按 5×10^3 个/孔接种于96孔板中,细胞贴壁后,设置对照组(溶剂处理的CNE-2细胞)、益气解毒方组(0.5、1.0、1.5、2.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、槲皮素组(20、40、60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、阳性对照顺铂组(3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。每组设置6个复孔,分别处理24、36、48 h后,弃原培养液,并加入CCK-8溶液100 μL /孔,继续孵育1 h后于酶标仪测450 nm处检测吸光度。实验重复3次。

RTCA实时无标记细胞功能分析仪操作参考文献^[8]进行。取RTCA检测专用孔板,测基线并平衡仪器后,加入细胞悬液,分组同CCK-8法,RTCA监测以细胞指数(cell index, CI)反映细胞增殖情况。 $\text{CI}=(\text{R}_n-\text{R}_b)/15$,其中 R_n 为电极阻抗值, R_b 为背景阻抗基线值,监测结束后均一化细胞指数计算药物相对增殖率,并绘制出细胞生长曲线。实验重复3次。

Cytation™ 5细胞成像多功能检测系统操作可参考文献^[9]进行。相同方法处理细胞悬液后,置于Cytation™ 5细胞成像多功能检测仪器上,间隔6 h拍照进行一次全板自动细胞数量捕获,计算细胞数和细胞相对增殖率。细胞相对增殖率=药物组细胞增殖数/对照组细胞相对增殖数 $\times 100\%$ 。

2.6 Western blot法检测蛋白表达水平

参考文献^[10]进行。药物处理细胞36 h后,将细胞加入RIPA裂解液,经冰上裂解、离心后,获得总蛋白提取液,采用BCA蛋白定量试剂盒进行定量,采用SDS-PAGE进行蛋白电泳,半干法将膜转印到PVDF膜上,将PVDF膜放入含5%脱脂奶粉的TBST封闭液中封闭1 h,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜,洗膜后加入二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,洗膜后,用Odyssey CLX双色红外荧光扫描成像系统分析蛋白表达。实验重复3次。

2.7 统计学分析

采用SPSS 25.0统计软件进行数据分析,服从

正态分布计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间计量资料比较采用单因素方差分析,多重比较,方差齐性用LSD检验,方差不齐用Dunnett's T3检验。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 益气解毒方有效成分筛选及ADME分析

利用TCMSP及BATMAN-TCM数据库筛选得到有效成分黄连14个、黄芪25个、白花蛇舌草5个、党参42个、茯苓12个、天花粉14个、甘草106个,去除重复化合物,共计197个有效成分,获得药物靶点493个,其中,部分中药存在共同成分。槲皮素为黄连、黄芪、白花蛇舌草和甘草共同成分,20-十六烷醇为黄芪、党参、茯苓、天花粉的共同成分;黄芪和甘草共同含有山柰酚、芒柄花黄素、异鼠李素等。按靶点度值排名,前5名分别是槲皮素、山柰酚、木犀草素、2-呋喃甲醛、壬二酸,度值高的活性成分有可能为益气解毒方的药理功能中发挥着较为重要作用的单体化合物,为后续单体研究抗鼻咽癌功效提供基础。

GeneCards、GEO、OMIM、PharmGkb、TTD 5个数据库中获取疾病作用靶点3112个,见图1A。在应用R语言软件Venny R插件绘制益气解毒方潜在靶点与鼻咽癌发病机制靶点韦恩图,共筛选出173个共同靶点,见图1B。Cytoscape软件构建“药物活

性成分-鼻咽癌靶点调控网络”。详见图2。

3.2 益气解毒方治疗鼻咽癌的PPI网络与关键靶点

应用STRING数据平台输入共同靶点名称,选择“high confidence:0.95”的模式下构建的PPI网络,其节点数为172个,边数为625个,平均节点度为7.27,平均局部聚类系数为0.442,说明益气解毒方治疗鼻咽癌的潜在作用靶点之间富集作用显著,见图3。采用Cytoscape软件中的CytoNCA工具包,连续两次通过DC、BC、CC、EC、LAC和NC进行网络拓扑属性筛选,图4A中的BC、CC、DC的平均值参数分别为245.22、0.36、9.61,图4B中的BC、CC、DC的平均值参数分别为540.54、0.43、20.37。经过两次过滤后得到4C图中的15个关键靶点,为PPI网络图中核心基因,其PPI关系也最直接、最密切。

3.3 益气解毒方治疗鼻咽癌所涉及的生物功能

GO分析结果显示益气解毒方治疗鼻咽癌主要涉及化学应激和活性氧反应等生物过程(biological process, BP),涉及的细胞组成(cellular component, CC)包括膜区、转录调节复合体等,影响的分子功能(molecular function, MF)主要集中在DNA结合转录因子结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性等方面,结果见图5A-C;KEGG分析显示,益气解毒方治疗鼻咽癌主要富集于PI3K/Akt、MAPK等信号通路,见图5D。

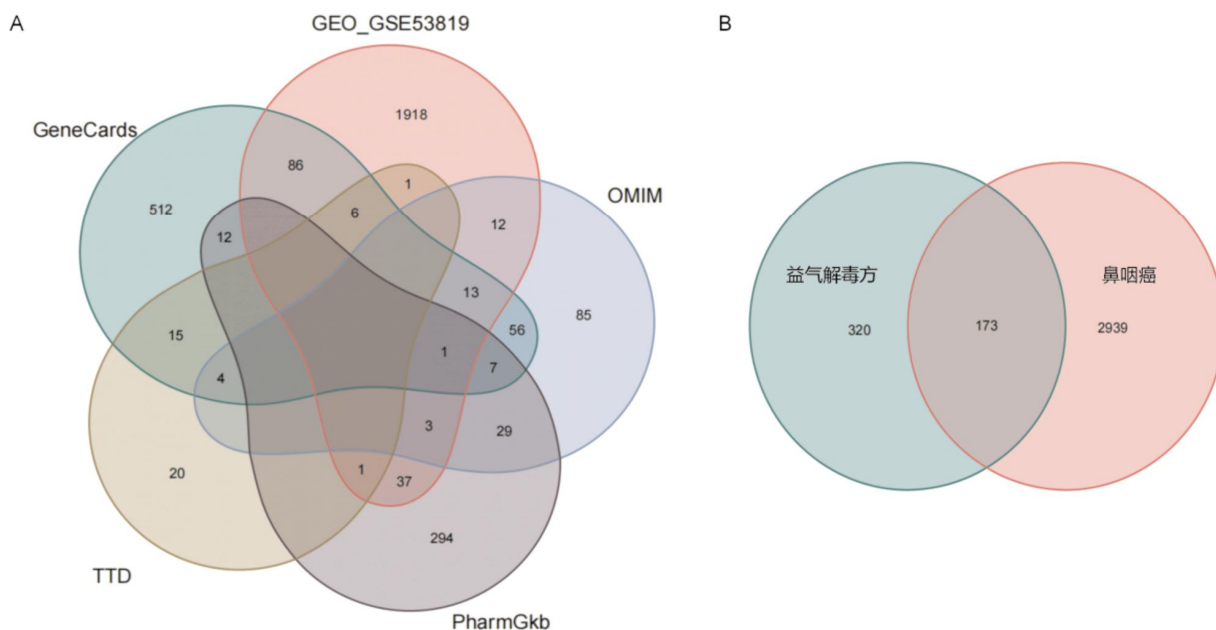


图1 益气解毒方-鼻咽癌靶点韦恩图

注:A.GeneCards、GEO、OMIM、PharmGkb、TTD数据库获取疾病靶点韦恩图;B.益气解毒方活性成分靶点与鼻咽癌疾病韦恩图。



图2 益气解毒方活性成分-鼻咽癌靶点基因互作网络

注:网络中的节点表示靶点或化合物,边表示活性成分靶点与鼻咽癌靶点之间的相互作用。

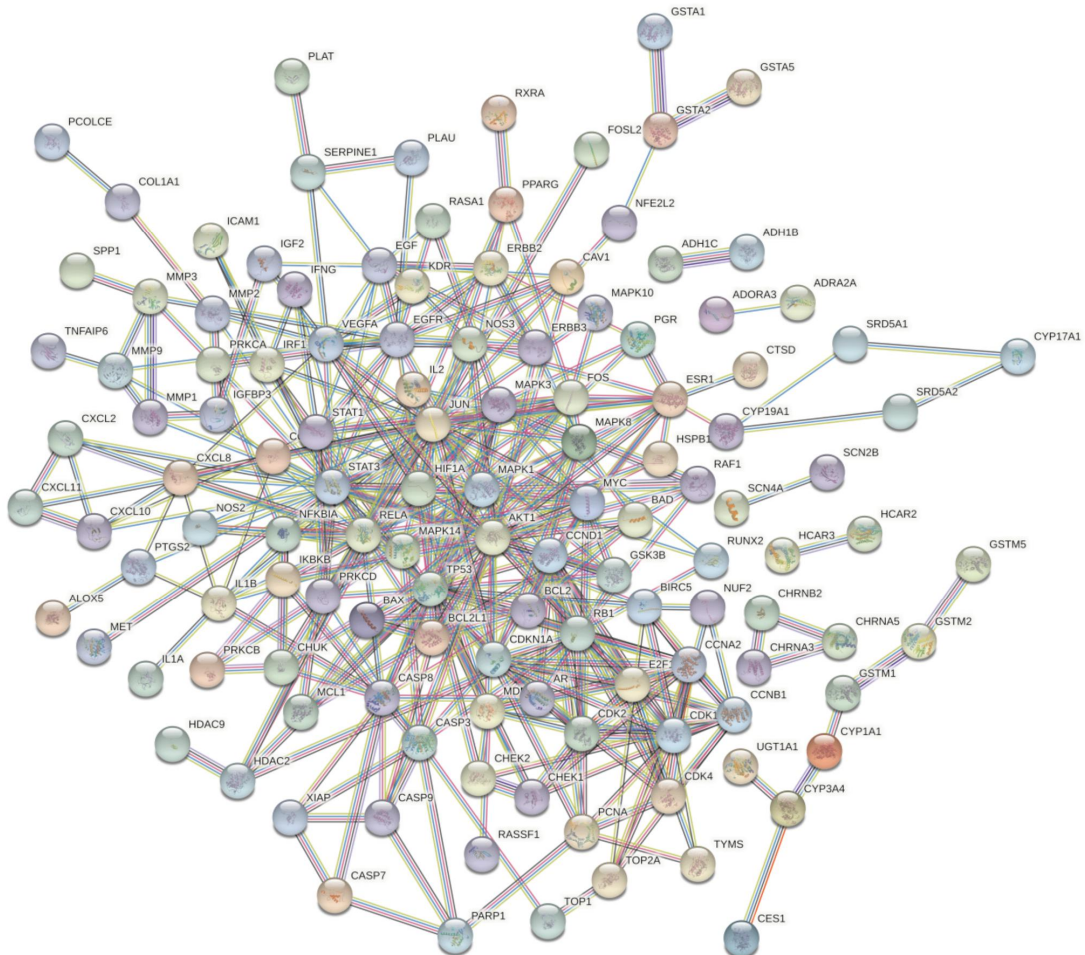


图3 共同靶点PPI网络图

3.4 槲皮素与核心靶蛋白的分子对接
槲皮素度值排名最高,且为黄连、黄芪、白花蛇

舌草和甘草共同成分,PI3K/Akt 信号通路中包含的核心靶点大部分为槲皮素的作用靶点,考虑槲皮素为

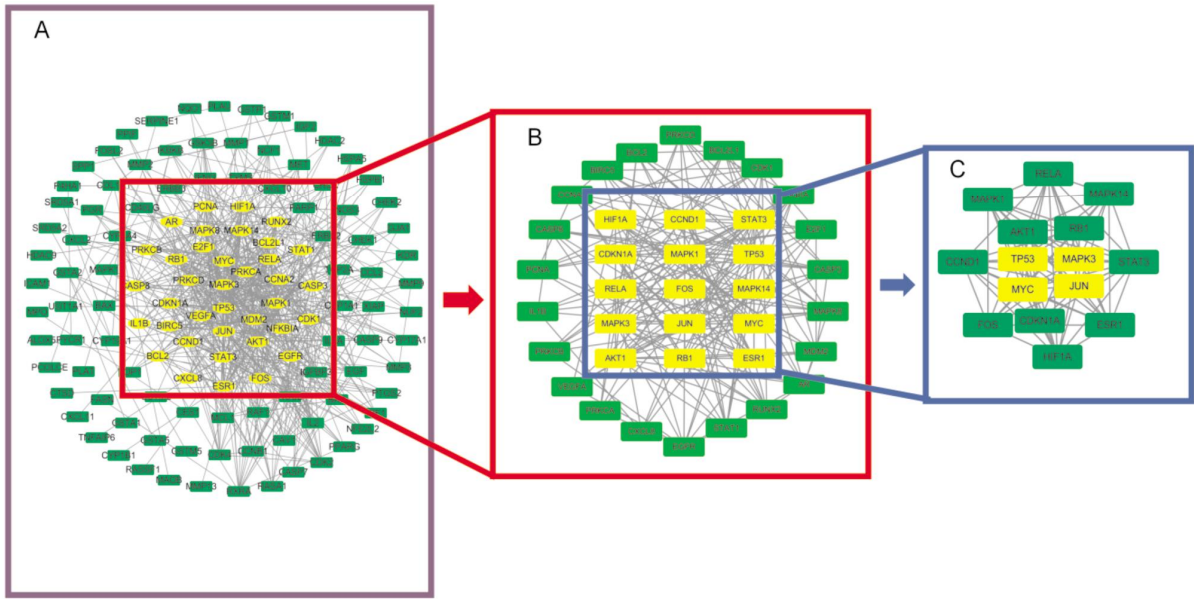


图4 益气解毒方关键节点的网络拓扑分析图

注:A.共同靶点关系图;B.第一次网络拓扑属性筛选;C.第二次网络拓扑属性筛选。

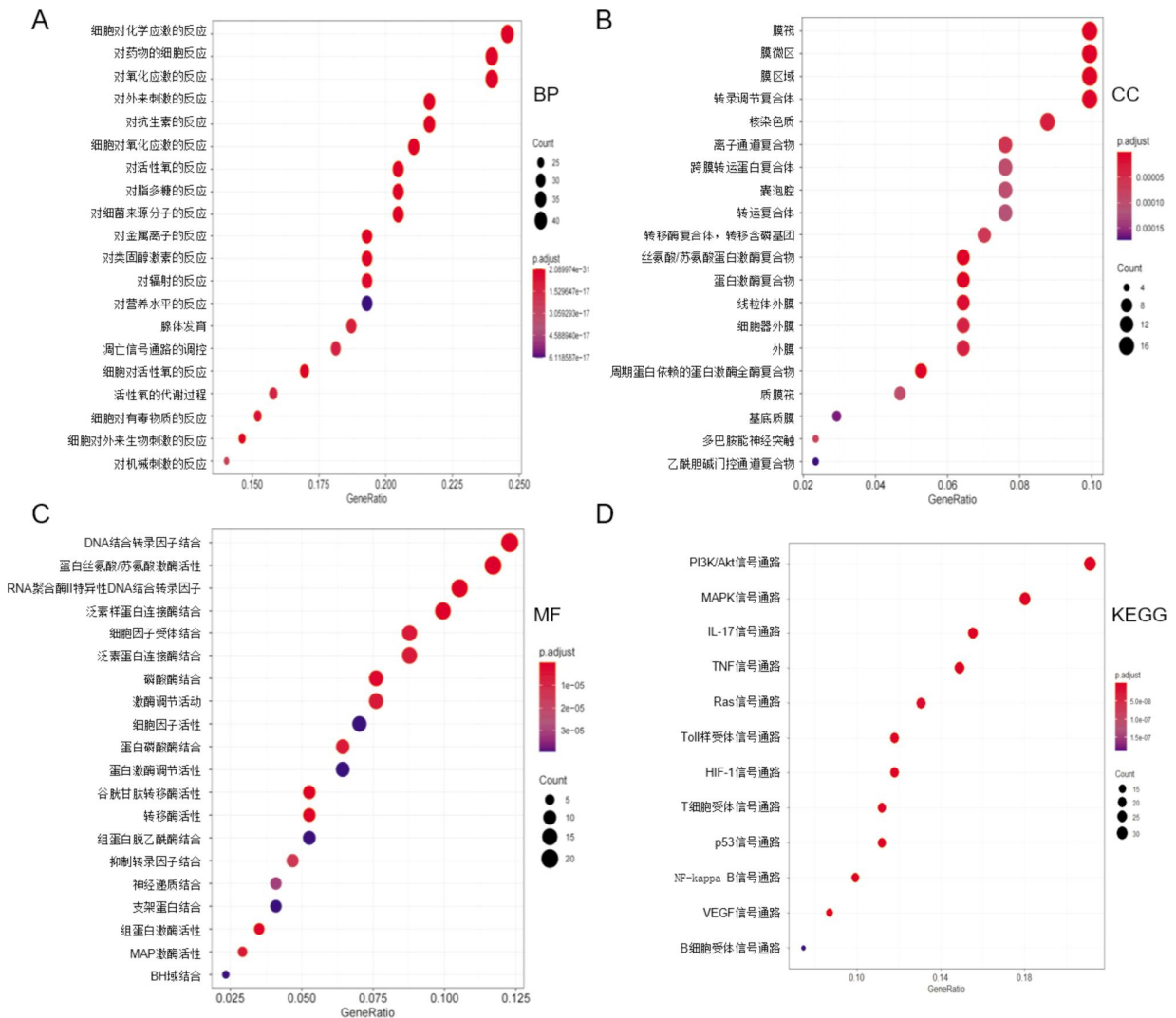


图5 益气解毒方作用于鼻咽癌的GO和KEGG分析

益气解毒方中最主要的活性化合物,分子对接结果(图6)显示,槲皮素与核心靶点 TP53、AKT1、MDM2、MYC 均具有良好的结合位点,其最低结合能分别是-9.81、-10.4、-7.7、-7.8 kcal·mol⁻¹。根据亲和力得分,在分子对接模拟中,槲皮素与 AKT1 对接分数最高,对接结果最稳定。

3.5 益气解毒方和槲皮素抑制鼻咽癌细胞增殖

与对照组比较,药物处理 24 h 后,1.0、1.5、2.0 g·L⁻¹ 的益气解毒方组和 40、60 μmol·L⁻¹ 的槲皮素组细胞增殖指数显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);处理 36 h

和 48 h 后,各浓度益气解毒方组和槲皮素组,细胞增殖指数均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。RTCA 监测结果同样显示益气解毒方和槲皮素能降低细胞增殖指数,两种方法结果提示益气解毒方和槲皮素能显著抑制鼻咽癌细胞增殖。详见图 7。

3.6 益气解毒方和槲皮素抑制鼻咽癌细胞增殖相关蛋白 XIAP、PCNA 和 Survivin 的表达

与对照组比较,1.0、2.0 g·L⁻¹ 益气解毒方和 40 μmol·L⁻¹ 的槲皮素处理 36 h 后,CNE-2 细胞增殖细胞蛋白 XIAP、PCNA 和 Survivin 表达水平均

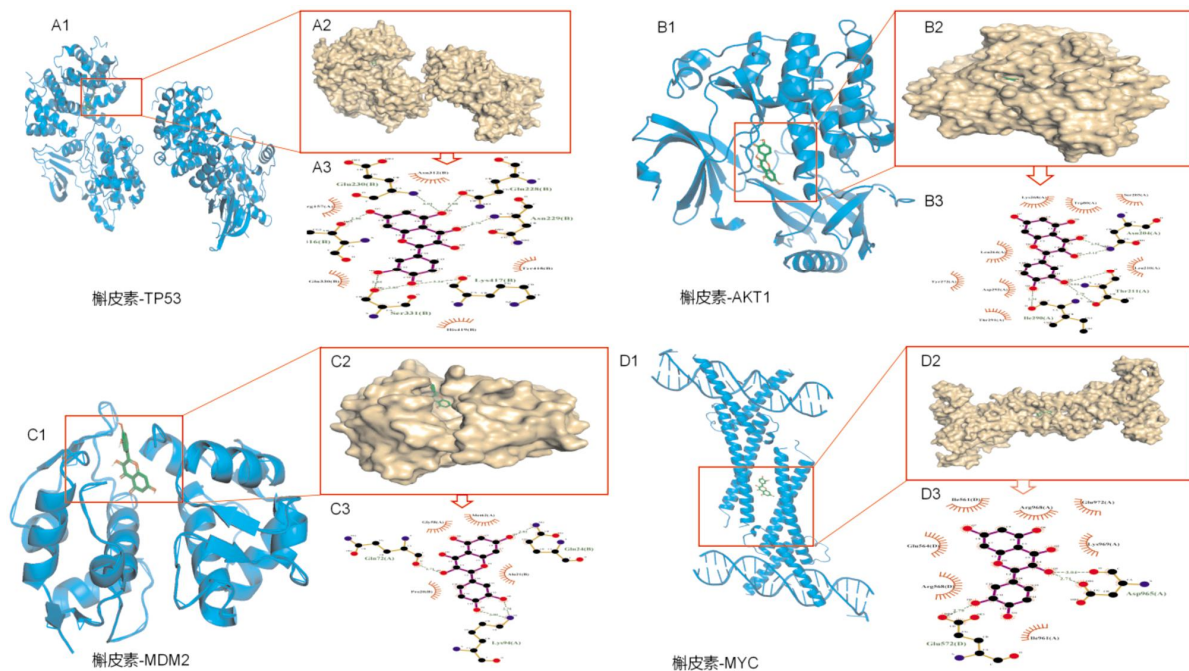


图6 槲皮素与 TP53、AKT1、MDM2、MYC 的分子对接

注:A1-D1.3D模型;A2-D2.范德华分子表面形式;A3-D3.2D模型。

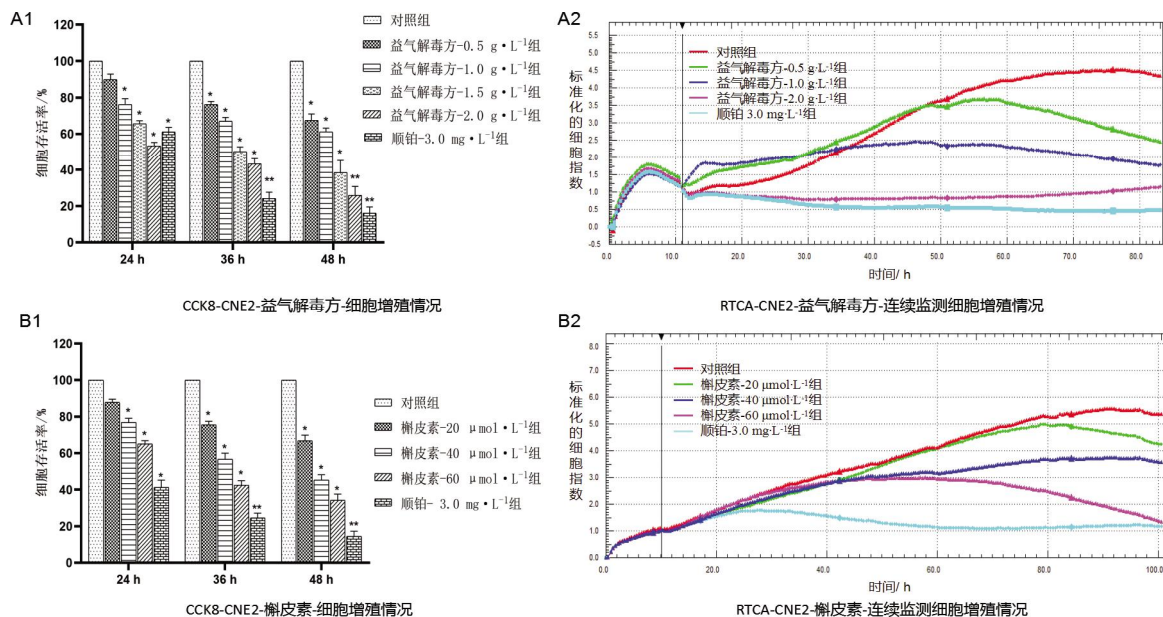


图7 益气解毒方和槲皮素对 CNE2 细胞增殖的影响

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

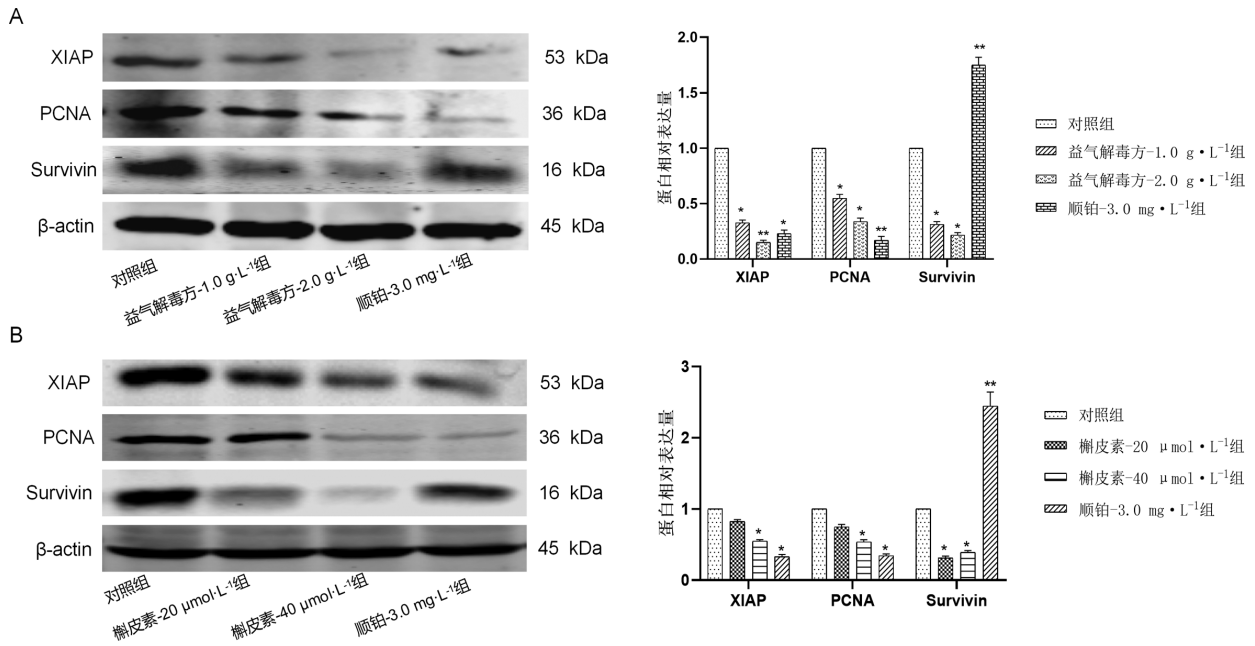


图8 益气解毒方和槲皮素对细胞增殖相关蛋白表达水平的影响

注:A.益气解毒方;B.槲皮素;与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$); $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的槲皮素也下调 Survivin 蛋白的表达水平($P<0.05$),但顺铂反而上调了 Survivin 表达水平($P<0.05$)。详见图8。

3.7 益气解毒方和槲皮素下调鼻咽癌细胞 PI3K/Akt 信号通路

与对照组比较, $1.0, 2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 益气解毒方和 $20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的槲皮素处理 36 h 后, CNE-2 细胞 PI3K、AKT1、p-AKT1、mTOR 蛋白表达水平均显著降低。详见图 9。

3.8 槲皮素通过 PI3K/Akt 信号通路抑制 CNE-2 细胞增殖

Western blot 结果(图 10A)显示,与对照组比较, $\text{SC79 } 2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组能上调 PI3K/Akt 信号通路关键蛋白 PI3K、p-AKT 的同时,也上调了增殖相关蛋白 XIAP、PCNA 的表达($P<0.05$);与槲皮素组比较, $\text{SC79 } 2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +槲皮素组可下调 PI3K/Akt 信号通路关键蛋白 PI3K、p-AKT 和增殖相关蛋白

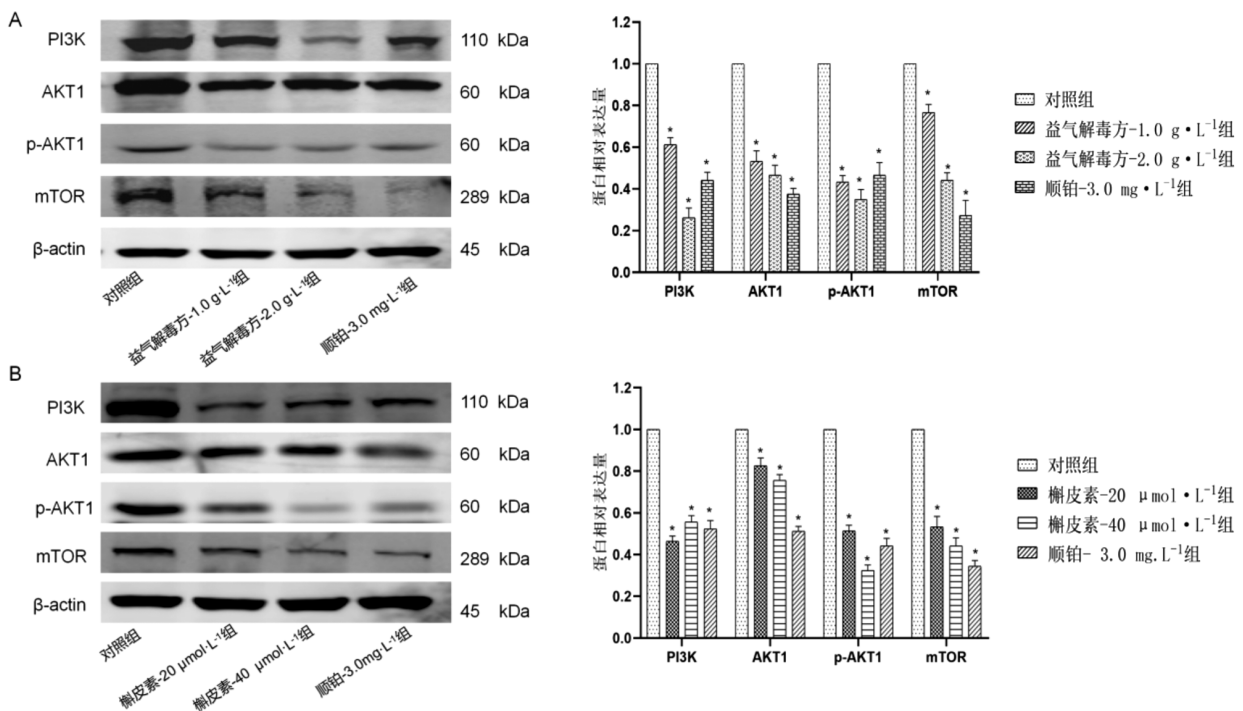


图9 益气解毒方和槲皮素对 PI3K/Akt 信号通路关键蛋白表达水平的影响

注:A.益气解毒方;B.槲皮素。与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

XIAP、PCNA 的效应($P<0.05$)。

RTCA 及 Cytation™ 5 细胞成像多功能检测系统监测显示(图 10B 和图 10C),与对照组比较,SC79 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著促进鼻咽癌细胞增殖($P<0.05$);LY294002 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组可抑制鼻咽癌细胞增殖($P<0.05$)。与槲皮素组比较,激活 PI3K/AKT 信号通路后,SC79 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与槲皮素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组可抑制鼻咽癌细胞增殖的效应。

4 讨论

网络药理学是临床医学、药理学和生物信息学的交叉学科。网络药理学方法可以通过构建药物成分网络和相关靶点模块,分析中药方剂的通路和活性成分的分子机制^[11-12]。为了探究益气解毒方抗鼻咽癌的潜在作用机制,本研究通过网络药理学方法建立了益气解毒方化学成分-靶点网络、靶点-疾病网络,预测益气解毒方治疗鼻咽癌的作用机制。本研究筛选出益气解毒方的 197 种有效单体成分,包括槲皮素、山柰酚、芒柄花黄素、异鼠李素、木犀草素、小檗碱等,上述单体大部分为黄酮类化合物,研究表明,黄酮类化合物可通过调节细胞凋亡、干扰细

胞转导、抑制癌细胞侵袭转移等多种机制发挥抗肿瘤作用^[13]。如山柰酚作为组蛋白去乙酰化酶抑制剂诱导细胞发生细胞凋亡、内质网应激、自噬和表观遗传修饰^[14-15]。芒柄花黄素近年来被发现对包括鼻咽癌在内的各种癌症治疗有效^[16],与舒尼替尼、表柔比星、多柔比星等化疗药物联合治疗可协同增强化疗药物的抗癌潜力。小檗碱是中药黄连中的主要生物碱,可通过干扰细胞周期、诱导细胞凋亡、影响核因子 κB 信号通路等途径抑制肿瘤细胞增殖^[17-18]。在天然植物中寻找有抗肿瘤作用的有效单体成分并探讨其作用机制,已成为近年来肿瘤学研究的一大热点,而网络药理学通过高通量筛选及网络分析技术,对药物、靶点、疾病之间的复杂生物化学信息进行构架、模拟和分析^[19],筛选药物作用于疾病的有效物质、作用靶点,帮助发掘化学活性成分,提高新药研发的成功率^[20]。

网络药理学通过功能分析,提前预测可能的核心生物学功能和通路,为探究疾病发生的机制和调控关系提供一些参考依据。KEGG 分析显示益气解毒方抗鼻咽癌主要涉及 PI3K/Akt、MAPK 等信号通路,已有研究表明,PI3K/Akt 信号通路与鼻咽癌的发生、发展密切相关,能够增强肿瘤细胞运动能力,

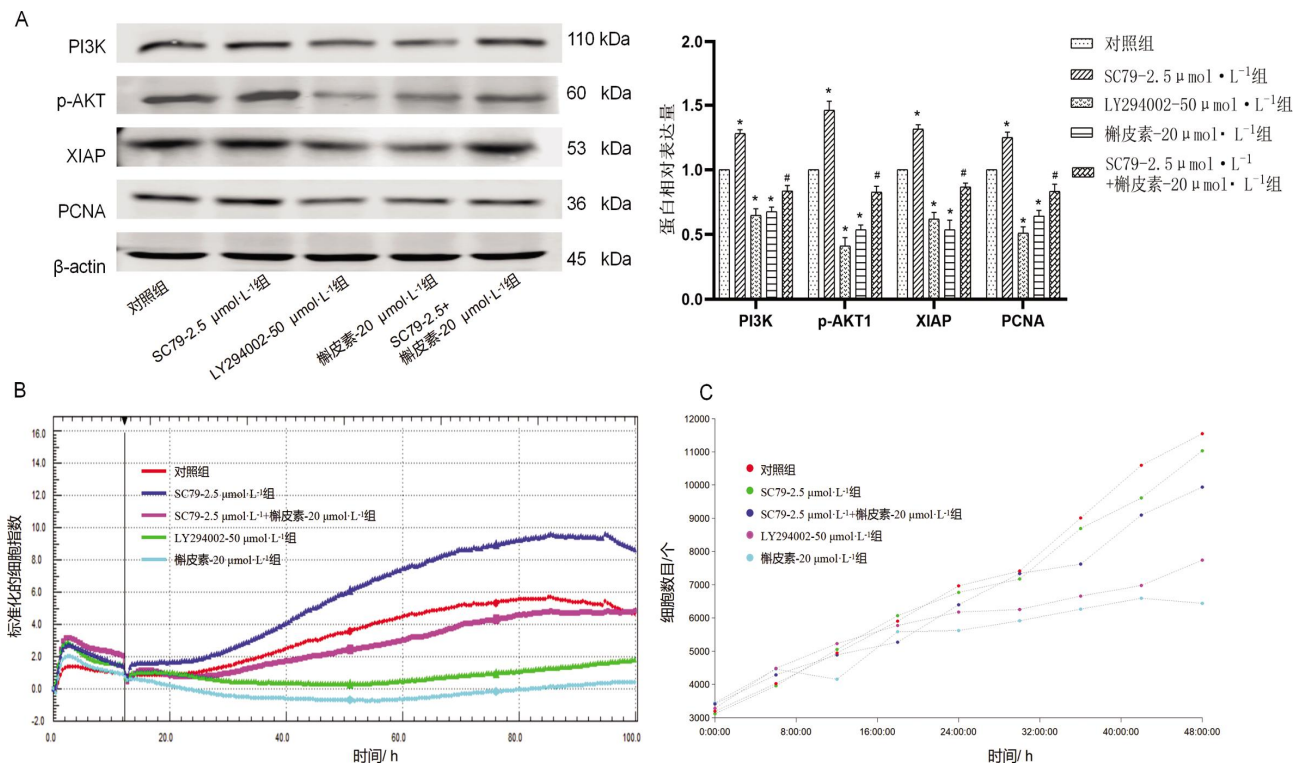


图 10 PI3K/Akt 信号通路在槲皮素抑制 CNE-2 细胞增殖中的作用

注:A.激活 PI3K/Akt 信号通路对槲皮素下调相关蛋白表达水平的影响;B.RTCA 监测激活 PI3K/Akt 信号通路对槲皮素抑制 CNE-2 细胞增殖效应的影响;C.Cytation™ 5 监测激活 PI3K/Akt 信号通路对槲皮素抑制 CNE-2 细胞增殖效应的影响。与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与槲皮素组比较,# $P<0.05$ 。

促进细胞外基质降解,并诱导血管内皮生长因子的释放^[21]。另外,槲皮素、山柰酚、小檗碱等天然生物活性成分已被研究证实可以通过调节 MAPK 信号通路影响癌症进展^[22],山柰酚可以通过 MAPK 和 TNF 信号通路抑制多种肿瘤细胞的迁移和侵袭,还可通过介导内皮细胞中 ERK/p38 和 PI3K/Akt 信号通路抑制 HIF-1 α 和 VEGFR2,调节血管的生成^[23]。本研究对核心基因和信号通路分别进行分子虚拟对接和 Western blot 验证,结果表明益气解毒方和其活性成分槲皮素能调控 Survivin、XIAP、PCNA 蛋白和 PI3K/Akt 信号通路蛋白的表达,抑制鼻咽癌细胞增殖;通过 PI3K/Akt 信号通路激活剂,进一步证明益气解毒方活性成分槲皮素抑制细胞增殖与下调 PI3K/Akt 信号通路密切相关。

综上所述,本研究利用网络药理学、分子对接技术和体外实验表明益气解毒方通过多靶点、多信号通路、多通路发挥抗鼻咽癌效应,其活性成分槲皮素通过下调 PI3K/Akt 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖,为益气解毒方在鼻咽癌临床治疗中的应用提供了依据。

参考文献

- [1] 江志超,田道法,范靖莹.益气解毒方对中晚期鼻咽癌患者 CD4⁺ CD25⁺调节性 T 细胞和 Th17 细胞的影响[J].中国中医药信息杂志,2014,21(2):23-26,31.
- [2] 何 兰,周芳亮,范婧莹,等.益气解毒方联合盐霉素抑制鼻咽癌干细胞增殖效应的研究[J].中华中医药杂志,2020,35(3):1164-1169.
- [3] 赵炳聪,李亚鸿,解红霞.网络药理学在中药复方作用机制研究中的应用[J].中国中医药信息杂志,2020,27(3):133-136.
- [4] 罗 欢,魏行云,刘 灵,等.益气解毒方水提物对人结肠癌 HCT-116 细胞凋亡及其 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2021,41(12):1857-1862.
- [5] 邹 攀,刘 洁,许红森,等.基于网络药理学探讨黄连和黄芪治疗鼻咽癌的作用机制[J].中国新药与临床杂志,2021,40(4):276-281.
- [6] 邹 攀,程 博,钟文良,等.基于网络药理学和生物信息学研究益气解毒方治疗鼻咽癌的分子机制[J].中成药,2022,44(6):2021-2027.
- [7] 刘 洁,史红健,熊 雨,等.黄芩苷通过 TGF- β 1/ERK1/2 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖[J].湖南中医药大学学报,2021,41(8):1154-1159.
- [8] 苏 芮,邹 攀,朱镇华,等.黄芩苷通过调控细胞自噬抑制鼻咽癌细胞增殖[J].生命的化学,2022,42(2):361-370.
- [9] 范婧莹,刘 洁,刘晓丹,等.益气解毒方通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(5):535-539.
- [10] 熊 雨,刘 洁,邹 攀,等.益气解毒方中苯丙素类化合物对鼻咽癌细胞增殖效应的影响[J].湖南中医药大学学报,2021,41(5):701-706.
- [11] 张彦琼,李 梢.网络药理学与中医药现代研究的若干进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2015,29(6):883-892.
- [12] 林瑞婷,陈芝强,林丽珠.基于网络药理学探讨桔梗-苦杏仁与肺癌相关分子机制[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(19):217-224.
- [13] 孙晓润,陈莘莘,林 悦,等.天然黄酮类化合物抗肿瘤作用靶点研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(6):218-228.
- [14] KIM T W, LEE S Y, KIM M, et al. Kaempferol induces autophagic cell death via IRE1-JNK-CHOP pathway and inhibition of G9a in gastric cancer cells [J]. Cell Death & Disease, 2018, 9: 875.
- [15] KIM H J, BAE S. Histone deacetylase inhibitors: Molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs [J]. American Journal of Translational Research, 2011, 3 (2): 166-179.
- [16] BERGER A, VENTURELLI S, KALLNISCHKIES M, et al. Kaempferol, a new nutrition-derived pan-inhibitor of human histone deacetylases[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2013, 24(6): 977-985.
- [17] WANG J X, YANG S, CAI X Q, et al. Berberine inhibits EGFR signaling and enhances the antitumor effects of EGFR inhibitors in gastric cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(46): 76076-76086.
- [18] 莫柱冰,陈少环.小檗碱抗肿瘤作用的研究进展[J].深圳中西医结合杂志,2015,25(14):193-194.
- [19] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: Theory, methodology and application[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2013, 11(2): 110-120.
- [20] 彭晓飞,王 丽,边育红.网络药理学研究相关技术与应用[J].天津中医药大学学报,2015,34(2):121-124.
- [21] JIANG H G, GAO M, SHEN Z H, et al. Blocking PI3K/Akt signaling attenuates metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells through induction of mesenchymal-epithelial reverting transition[J]. Oncology Reports, 2014, 32(2): 559-566.
- [22] BRAICU C, BUSE M, BUSUIOC C, et al. A comprehensive review on MAPK: A promising therapeutic target in cancer[J]. Cancers, 2019, 11(10): 1618-1645.
- [23] HUNG T W, CHEN P N, WU H C, et al. Kaempferol inhibits the invasion and migration of renal cancer cells through the downregulation of AKT and FAK pathways[J]. International Journal of Medical Sciences, 2017, 14(10): 984-993.

(本文编辑 苏 维)